

JC14 Rec'd PCT/PTO 07 JUL 2005

DOCKET NO.: 275010US0XPCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Alain PROCHIANTZ, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/03951

INTERNATIONAL FILING DATE: December 31, 2003

FOR: COMPOSITION FOR INTRACELLULAR TRANSPORT OF BIOLOGICAL PARTICLES
OR MACROMOLECULES**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
France	03 00093	07 January 2003

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/03951.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

BEST AVAILABLE COPY

DOMESTIC PRIORITY INFORMATION

Application::	Continuity Type::	Parent Application::	Parent Filing Date::
This Application	National Stage of	PCT/FR03/03951	12/31/03

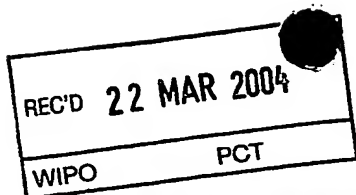
FOREIGN PRIORITY INFORMATION

Application Number:	Country::	Filing Date::	Priority Claimed::
03/00093	France	01/07/03	YES

ASSIGNMENT INFORMATION

Assignee Name:: Centre National De La Recherche Scient.
Street of Mailing Address:: 3 rue de Michel-Ange
City of Mailing Address:: Paris
Country of Mailing Address:: France
Postal or Zip Code of Mailing Address:: 75016

Assignee Name:: Ecole Normale Superieure
Street of Mailing Address:: 45, rue d'Ulm
City of Mailing Address:: Paris Cedex 05
Country of Mailing Address:: France
Postal or Zip Code of Mailing Address:: 75230



POUR FR 03/03951
Rec'd 07 JUL 2005

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 JAN. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 • W / 210502

REMISE DES REMPLISSABLES DATE 07 JAN 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 07 JAN. 2003		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 36, rue de St Pétersbourg 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) MJPbv644/91			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) COMPOSITION POUR LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE DE MACROMOLECULES OU PARTICULES BIOLOGIQUES.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	3, rue Michel Ange	
	Code postal et ville	75016 PARIS	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PLACES DATE 7 JAN 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0300093		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 210502
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)			
Nom		VIALLE-PRESLES	
Prénom		Marie José	
Cabinet ou Société		CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	36, rue de St-Petersbourg	
	Code postal et ville	75 010 PARIS	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00	
N° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88	
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com	
7 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques.			
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)			
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1	
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 7 janvier 2003 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI C. TRAN	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



REMISE DES PIÈCES DATE JAN 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0300093 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI																															
Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv644/91																															
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> N° Pays ou organisation Date <table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> N° Pays ou organisation Date <table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> N°																															
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique																															
Nom ou dénomination sociale		ECOLE NORMALE SUPERIEURE																															
Prénoms																																	
Forme juridique		Etablissement public																															
N° SIREN		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																															
Code APE-NAF		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																															
Domicile ou siège	Rue	45, rue d'Ulm																															
	Code postal et ville	75151 PARIS Cedex 05																															
	Pays	FRANCE																															
Nationalité		FRANCAISE																															
N° de téléphone (facultatif)																																	
N° de télécopie (facultatif)																																	
Adresse électronique (facultatif)																																	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique																															
Nom ou dénomination sociale																																	
Prénoms																																	
Forme juridique																																	
N° SIREN		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																															
Code APE-NAF		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																															
Domicile ou siège	Rue																																
	Code postal et ville	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																															
Pays																																	
Nationalité																																	
N° de téléphone (facultatif)																																	
N° de télécopie (facultatif)																																	
Adresse électronique (facultatif)																																	
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 7 janvier 2003 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)																															
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI C. TRAN																															

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

La présente invention est relative à de nouveaux moyens de transfert intracellulaire de macromolécules ou de particules d'intérêt.

L'importation de macromolécules, et notamment de polynucléotides ou de protéines, dans des cellules animales vivantes constitue une approche de base, aussi bien pour la recherche fondamentale que dans le cadre de diverses applications, par exemple en thérapie génique.

L'une des difficultés majeures de cette approche résulte de la nécessité de transporter ces macromolécules à travers la membrane cellulaire.

Ce problème a fait l'objet de nombreuses recherches, qui ont abouti à la mise au point de différentes méthodes de transfert intracellulaire et de différents types de vecteurs.

Ainsi, l'introduction de polynucléotides dans les cellules repose actuellement pour l'essentiel sur des techniques de transfection (phosphate de calcium, électroporation), de lipofection (liposomes, lipides chargés) ou d'infection virale (lentivirus, adénovirus, virus de l'herpès, etc.) ou sur l'utilisation de nanoparticules.

Plus récemment, il a été proposé d'utiliser des peptides transducteurs. On désigne sous ce terme des peptides comprenant, ou constitués par, une séquence dénommée " domaine de transduction " leur conférant la capacité de pénétrer à l'intérieur d'une cellule vivante, indépendamment de la présence de transporteurs ou de récepteurs spécifiques.

Des articles de revue concernant les peptides transducteurs ont été publiés récemment par LIDGREN et al., TIPS, 21, 99-102, (2000) ; SCHWARZE et DOWDY TIPS, 21, 45-48, (2000) ; SCHWARZE et al. Trends Cell. Biol., 10, 290-295, (2000) ; PROCHIANTZ Current Opinion in Cell Biology, 12, 400-406, (2000) ; Cell-Penetrating Peptides. Processes and applications. Ed. Ulo Langel. CRC Press (2002).

A titre d'exemples de peptides transducteurs, on citera en particulier :

- les pénétratines, qui sont des peptides dérivés de la troisième hélice d'un homéodomaine ; des peptides de la famille des pénétratines sont décrits par exemple dans les publications de JOLIOT et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1864-1868, (1991) ; DEROSSI et al. J. Biol. Chem., 269, 14, 10444-10450, (1994) ; BRUGIDOU et al. Biophys. Biochem. Res. Com., 214, 685-693, (1995), ainsi que dans le Brevet US 5888762, le Brevet US 6080724, ou la Demande PCT WO 00/01417 ;

- les peptides dérivés de la protéine Tat de HIV1, et en particulier du fragment 48-60 de ladite protéine ; de tels peptides sont décrits par exemple par FAWELL et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 664-668, (1994) ou par VIVES et al. J. Biol. Chem., 272, 16010-16017, (1997).

- les peptides dérivés de la protéine VP22 de HSV ; de tels peptides sont décrits par exemple par ELLIOTT et O'HARE Cell, 88, 223-233, (1997) ;

- des peptides dérivés d'une séquence signal conjuguée à une séquence de localisation nucléaire ; de tels peptides sont décrits par exemple par LIN et al. J. Biol. Chem., 270, 14255-14258, (1995) ; J. Biol. Chem., 271, 5305-5308, (1996), LIU et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11819-11824, (1996), MORRIS et al. Nucleic Acids Res., 25, 2730-2736, (1997), CHALOIN et al. Biochemistry, 36, 11179-11187, (1997) ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 243, 601-608, (1998), ZHANG et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 9184-9189, (1998) ;

- les transportanes qui sont dérivés d'une fusion entre une portion d'un neuropeptide, la galanine, et un peptide du venin de guêpe POOGA et al., FASEB J., 12, 67-77, (1998) ; Ann. New York Acad. Sci., 863, 450-453, (1998).

Les peptides transducteurs peuvent importer dans des cellules vivantes, notamment des cellules animales, des molécules ou complexes moléculaires de nature variée (acides nucléiques, protéines, peptides/acides nucléiques, analogues de nucléotides, liposomes).

Ces molécules ou complexes moléculaires sont habituellement désignés sous le terme général de " cargos ".

Il a été rapporté que certains peptides transducteurs pouvaient importer des cargos de taille importante.

Ainsi, LEWIN et al. (Nat. Biotech, 18, 410-414, 2000) ont conjugué un dérivé du peptide transducteur TAT 48-60 à des nanoparticules constituées d'un noyau d'oxyde de fer enrobé d'une enveloppe de dextrane, et ont observé que les nanoparticules ainsi modifiées (de diamètre 45 nm) étaient importées dans des cellules vivantes.

EGUCHI et al. (J. Biol. Chem., 276, 28, 26204-26210, 2001) ont construit des phages λ recombinants exprimant à leur surface une protéine chimérique comprenant le peptide transducteur TAT fusionné à l'extrémité N-terminale de la protéine D du phage, et contenant un gène marqueur. Ils ont observé, après incubation de ces phages avec des cellules COS-1 en culture, une expression intracellulaire du gène marqueur dans une proportion de ces cellules pouvant aller jusqu'à 30%.

Il est toutefois généralement considéré que l'une des limitations majeures des peptides transducteurs mentionnés ci-dessus, tels que les pénétratines ou les peptides TAT, réside dans la nécessité de coupler par liaison(s) covalente(s) le peptide transducteur et le cargo.

Dans le but de s'affranchir de cette limitation, des peptides conçus pour se lier par interactions ioniques ou hydrophobes soit avec des acides nucléiques soit avec des protéines, ont été construits. L'un de ces peptides, dénommé MPG, est destiné au transport intracellulaire d'acides nucléiques (MORRIS et al., Nucl. Acids Res., 2730-2736, 1997 ; Nucl. Acids Res., 3510-3517, 1999) ; il comprend deux régions distinctes, séparés par un peptide de liaison : une région hydrophobe N-terminale dérivée de la séquence signal riche en glycine de la protéine gp41 de HIV1, permettant la fusion avec la membrane cellulaire, et une région hydrophile dérivée de la séquence de localisation nucléaire de

l'antigène T de SV40, permettant l'interaction du peptide avec l'acide nucléique, et son adressage nucléaire.

L'autre, dénommé Pep-1 (MORRIS et al., Nature Biotech, 19, 1173-1176, 2001) est destiné au transport de protéines. Il diffère de MPG par la nature de la région hydrophobe N-terminale, qui est constituée par une séquence riche en tryptophane, destinée à permettre l'adressage à la membrane cellulaire et la formation d'interactions hydrophobes avec les protéines.

Ces deux types de peptides sont également décrits dans la demande PCT WO 02/10201, qui propose, de manière générale, d'utiliser pour importer des protéines dans des cellules vivantes des peptides de 16 à 30 acides aminés comprenant deux domaines successifs distincts : un domaine hydrophobe, contenant 3 à 5 résidus tryptophane dont au moins une paire Trp-Trp, alternant avec des résidus acide glutamique et thréonine ; un domaine hydrophile contenant 4 ou 5 résidus basiques (lysine ou arginine) consécutifs, ces deux domaines étant éventuellement séparés par un domaine espaceur contenant un résidu proline ou un résidu glutamine. Une importation efficace n'a été toutefois observée que dans le cas des peptides portant en outre un groupe cystéamine.

Par ailleurs, dans le cadre de travaux sur les propriétés des peptides transducteurs de la famille des pénétratines les Inventeurs ont évalué la capacité de ces peptides à importer des cargos de taille importante. Dans ce but, ils ont testé l'un de ces peptides, en utilisant comme cargo un phage λ . Ils ont alors constaté non seulement que ce peptide était capable d'importer le phage dans une cellule animale, mais encore que, contrairement à ce que l'on supposait jusqu'à présent, l'importation pouvait s'effectuer sans qu'il soit nécessaire de coupler le peptide et le phage par liaison covalente. En outre les Inventeurs ont constaté que l'efficacité de cette importation était bien supérieure à celle observée par EGUCHI et al. avec le peptide transducteur TAT couplé par liaison peptidique à l'extrémité N-terminale de la protéine D du phage λ .

Pour expliquer ces résultats, surprenants au vu de la différence de structure entre les pénétratines et les peptides de la Demande PCT WO 02/10201, les Inventeurs proposent l'hypothèse suivante : les pénétratines ont un domaine de transduction capable d'adopter une structure secondaire (en hélice α ou en feuillet β) amphiphile, possédant une face présentant des résidus hydrophobes, et une face chargée comprenant un résidu tryptophane encadré par 2 résidus basiques assurant l'interaction avec les membranes et la formation d'une micelle inverse permettant l'internalisation du peptide dans la cellule. Par exemple, dans le cas de la pénétratine-type pANTP, les résidus Ile, Trp, Phe en positions 3, 14, et 7 de la séquence peptidique, forment dans l'hélice α un triplet hydrophobe ; ce triplet hydrophobe est distant de la zone chargée constituée par les résidus Lys (position 13 de la séquence peptidique) et Arg (position 10 de la séquence peptidique), qui dans l'hélice α encadrent le résidu Trp en position 6 de la séquence peptidique (DEROSSY et al. J. Biol. Chem, 271, p 18188-18193, 1996).

Il est supposé que la face hydrophobe du domaine de transduction permet la formation d'interactions de force suffisante pour assurer une fixation stable du peptide transducteur au cargo. L'interaction avec la membrane se ferait par la face chargée du domaine de transduction ; le Trp encadré par deux acides aminés chargés peut s'insérer dans la membrane, (cette insertion a été observée par des études de fluorescence du tryptophane), la déstabilisant et permettant le passage du vecteur et de son cargo.

La présente invention a pour objet un procédé pour préparer une composition permettant d'introduire dans une cellule vivante, en particulier une cellule eucaryote, et notamment une cellule animale, un cargo constitué par une macromolécule ou un assemblage moléculaire (par exemple une particule), de taille inférieure ou égale à environ 1 μm dans sa plus grande dimension, ledit cargo présentant à sa surface un ou plusieurs domaines hydrophobes, lequel procédé est

caractérisé en ce qu'il comprend l'adsorption sur le ou lesdits domaines hydrophobes, d'au moins un peptide transducteur, à l'exception des peptides décrits dans la Demande PCT WO 02/10201.

5 Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ledit cargo est une protéine ou une particule possédant une surface de nature protéique.

Il est également possible d'utiliser comme cargo des liposomes, des nanoparticules, des glycolipides, ou toute
10 combinaison macromoléculaire naturelle ou artificielle.

Selon un autre mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ledit cargo est généralement de taille inférieure ou égale à 500 nm dans sa plus grande dimension.

Ceci englobe par exemple des particules virales
15 ou pseudovirales, notamment des particules phagiques.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ledit peptide transducteur est un peptide de la famille des pénétratines.

On définit ici comme " peptide de la famille des
20 pénétratines " tout peptide comprenant un domaine de transduction capable d'adopter une structure secondaire amphiphile (en hélice α ou en feuillet β) présentant une face comprenant des résidus hydrophobe permettant l'interaction avec le cargo, et une face permettant l'interaction avec les
25 membranes, comprenant un résidu tryptophane encadré de résidus basiques.

Ceci englobe notamment les pénétratines décrites dans la demande PCT WO 00/01417, et plus particulièrement celles comprenant un domaine de transduction défini par l'une
30 des formules ci-après :

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}$ (I)

$X_{16}-X_{15}-X_{14}-X_{13}-X_{12}-X_{11}-X_{10}-X_9-X_8-X_7-X_6-X_5-X_4-X_3-X_2-X_1$ (Ia)

dans laquelle X_6 représente un résidu tryptophane, X_1 , X_2 , X_4 , X_9 , X_{15} , X_{16} , sont des acides aminés
35 non-hydrophobes et X_3 , X_7 , et X_{14} , sont des acides aminés hydrophobes.

Des domaines de transduction particulièrement préférés pour la mise en œuvre de la présente invention sont ceux dans lesquels X_{10} et X_{13} sont des acides aminés basiques.

On peut également utiliser des dérivés de pénétratines, par exemple certaines des pénétratines tronquées ou substituées décrites dans la Demande PCT WO 00/01417, ou la Demande PCT WO 00/29427.

On peut aussi utiliser un peptide transducteur comprenant, outre le domaine de transduction, un ou plusieurs autres domaines fonctionnels ; à titre d'exemple, on citera les peptides comprenant un domaine de transduction et une séquence d'export nucléaire décrits dans la Demande PCT WO 02/39947.

L'adsorption du peptide transducteur s'effectue de manière simple, par incubation pendant au moins 15 minutes, de préférence pendant 30 à 60 minutes, dudit peptide transducteur avec le cargo.

L'incubation peut s'effectuer ex vivo ou in vivo, dans une gamme de températures très large, généralement comprise entre 15 et 40°C. On opérera de préférence à température ambiante, c'est-à-dire aux environs de 20 à 25°C, ou aux températures physiologiques (aux environs de 37°C), dans un milieu à pH neutre ; il peut s'agir par exemple d'un milieu de culture pour cellules, ou d'une solution de NaCl (9 g/l).

Le rapport molaire peptide transducteur/cargo dans le milieu d'incubation dépend notamment de la taille du cargo, par exemple, dans le cas d'un bactériophage, on peut utiliser un rapport molaire correspondant à 1.000 à 500.000 molécules de peptide par bactériophage.

La présente invention a également pour objet une composition comprenant un cargo à la surface duquel est adsorbé un peptide transducteur, susceptible d'être obtenue par le procédé conforme à l'invention.

Les compositions conformes à l'invention peuvent être utilisées immédiatement après leur préparation ; le cas échéant, elles peuvent également être conservées pendant au

moins 3 jours dans le milieu d'incubation, à des températures comprises entre 4°C et 37°C environ.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de compositions conformes à l'invention pour introduire un cargo, tel que défini ci-dessus, dans une cellule vivante.

En particulier la présente invention a ainsi pour objet un procédé pour introduire un cargo dans une cellule vivante, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact de ladite cellule avec une composition conforme à l'invention comprenant ledit cargo.

Le procédé conforme à l'invention peut être mis en œuvre sur des cellules en culture, par addition à la culture d'une composition conforme à l'invention, et incubation pendant 1 à 14 heures, de préférence pendant 2 à 6 heures.

De préférence, la composition conforme à l'invention est utilisée à raison de 10.000 à 20.000 complexes cargo/peptide transducteur par cellule.

Le procédé conforme à l'invention peut également être mis en œuvre *in vivo*, par exemple par injection d'une composition conforme à l'invention à un animal.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une composition conforme à l'invention pour l'obtention d'un médicament, et en particulier en tant que vecteur d'un principe actif constitué par le cargo ou contenu dans celui-ci.

La présente invention présente l'avantage de permettre d'introduire dans des cellules vivantes tout cargo hydrophobe ou dont la surface présente au moins un domaine hydrophobe, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer un couplage préalable par liaison covalente entre le cargo et le peptide transducteur. La présente invention présente un intérêt tout particulier pour introduire dans des cellules vivantes des particules virales ou pseudovirales, notamment des bactériophages, renfermant des polynucléotides d'intérêt que l'on souhaite exprimer dans lesdites cellules.

Ces particules peuvent ainsi être utilisées par exemple comme vecteurs de thérapie génique, *in vivo* ou *ex vivo*. On peut également préparer des compositions conformes à l'invention à partir de banques de phages contenant des polynucléotides codant pour des polypeptides divers, susceptibles de modifier le comportement de certaines cellules (migration, prolifération, différenciation, etc.), et utiliser ces compositions pour faire entrer ces banques de phages dans des tissus, en culture ou *in vivo*, et identifier des séquences régulatrices de ces comportements.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs, illustrant la mise en œuvre de la présente invention, pour introduire des phages dans des cellules vivantes.

EXEMPLE 1 : ADSORPTION D'UN PEPTIDE TRANSDUCTEUR SUR DES BACTERIOPHAGES LAMDA

Préparation des phages :

Le gène de la protéine autofluorescente EGFP (CLONTECH) ou celui de l'homéoprotéine En2 (Engrailed2) de poulet (LOGAN et al., 1992, Dev Genetics 13: 345-358) ont été placés sous le contrôle du promoteur CMV et en amont de la séquence de polyadénylation de SV40, dans un plasmide dérivé de pBK-CMV (STRATAGENE) possédant un site EcoRI unique en amont du promoteur CMV, et un site SalI unique en aval du signal de polyadénylation.

La fonctionnalité de ces constructions a été vérifiée par électroporation et expression transitoire en cellules COS, et détection de l'autofluorescence de la GFP ou détection immunocytochimique de la protéine Engrailed 2 à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre cette protéine (don du Dr S. SAULE, UMR 146, Institut Curie, Orsay).

Le fragment encadré par les deux sites uniques (EcoRI et SalI) a ensuite été transféré dans le génome du phage Lambda-ZAP (STRATAGENE), entre les sites EcoRI et XhoI, et l'ADN recombinant a été encapsidé *in vitro* à l'aide des

réactifs GIGAPACK PLUS (STRATAGENE). Les phages résultants (respectivement dénommés Lambda-ZAP-GFP et Lambda-ZAP-En2) ont permis l'infection de bactéries compétentes (souche XL1Blue-MRF', STRATAGENE), puis ont été titrés et stockés
 5 après un premier tour d'amplification. Pour contrôler la qualité des recombinants obtenus, les phagemides internes aux génomes des phages Lambda recombinants ont été excisés automatiquement par co-infection de bactéries XL1Blue-MRF' avec un phage auxilliaire (ExAssist, STRATAGENE). Après
 10 culture en milieu liquide, les bactéries encore vivantes et les virions Lambda sont détruits par chauffage, et on récupère les phages filamenteux recombinants. Les formes plasmidiques de ces phagemides recombinants sont récupérées après infection de bactéries non permissives pour la
 15 réplication du phage filamenteux (souche SOLR, STRATAGENE), et l'intégrité fonctionnelle des plasmides excisés est vérifiée par électroporation dans les cellules COS. Après cette vérification, les phages Lambda recombinants sont amplifiés pour atteindre un titre d'au moins 10^{11} particules
 20 par ml, puis concentrés au PEG, dialysés contre du PBS additionné de Ca^{++} et de Mg^{++} , et stockés à 4°C.

Adsorption du peptide transducteur :

Le peptide transducteur utilisé est une pénétratine de séquence :

25 RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:1)
 correspondant à l'hélice 3 du peptide pAntp (homéodomaine de la protéine Antennapedia de drosophile).

La pénétratine biotinylée est mélangée aux phages recombinants, à raison de 10 µg de peptide pour 10^9
 30 particules phagiques, dans 50 à 100 µl de milieu approprié (milieu DMEM/F12 (1:1) ou PBS-Dulbecco). Le mélange est incubé à température de la pièce pendant 30 min.

EXEMPLE 2 : INTRODUCTION DE PHAGES DANS DES CELLULES EN CULTURE

35 Les cellules utilisées sont des cellules épithéliales de rein de chien (MDCK).

Les phages utilisés sont marqués au fluorochrome Cy3 (AMERSHAM) par liaison covalente du fluorochrome aux protéines de capsid, selon les instructions du fabricant. Ils sont ensuite incubés en présence de pénétratine, comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus. A titre de contrôle négatif, on utilise des phages marqués au fluorochrome Cy3, incubés dans les mêmes conditions en l'absence de pénétratine.

La préparation phages/pénétratine, ou la préparation témoin est ajoutée au milieu de culture ou de suspension des cellules (selon que les cellules traitées ont déjà été ensemencées ou qu'elles viennent d'être dissociées) à raison de 10.000 phages/cellule, et laissée au contact des cellules pendant 4 heures.

Les cellules sont ensuite lavées et remises en culture dans du milieu frais, puis fixées dans du paraformaldéhyde 4% en PBS durant 10 min à température ambiante, rincées en PBS et montées dans du milieu de montage pour spécimens fluorescents DAKO contenant 1µg/ml de DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole). Elles sont ensuite observées sous un microscope confocal à épifluorescence type Leica TCS. Les images sont analysées et traitées à l'aide du logiciel PHOTOSHOP d'Adobe.

Les résultats sont illustrés par la Figure 1 :

Figure 1 A : préparation témoin avec phage sans pénétratine

Figure 1 B : préparation phage/pénétratine

On observe une importante fluorescence intracellulaire chez les cellules ayant reçu la préparation phages/pénétratine. En revanche, dans le cas des cellules n'ayant reçu que la préparation de phages, aucune fluorescence n'est observée.

EXEMPLE 3: INTRODUCTION DE PHAGES LAMBDA IN VIVO DANS DES CELLULES DE CERVEAU DE SOURIS

Différentes préparations phages/pénétratine (phages recombinants exprimant la GFP ; phages recombinants exprimant En2 ; phages marqués au fluorochrome Cy3) sont

administrées à des souris adultes par infusion dans le ventricule latéral du cerveau.

A J-1 avant l'infusion, les phages (solution à $6,5 \cdot 10^8$ pfu/ μ l) sont dialysés contre du NaCl 0,9% contenant 10 mM de $MgCl_2$ (pour la stabilité du phage) à 4°C durant la nuit. Le jour de l'infusion, on réalise le mélange phage/pénétratine : 70 μ l de la solution de phages dialysés contre du NaCl 0,9% (soit $6,5 \cdot 10^{10}$ pfu) + 3 μ l de NaCl 9% + 27 μ l de la solution stock de pénétratine (soit 162 μ g), soit environ 5×10^5 molécules de pénétratine par particule de phage. 100 μ l de mélange sont chargés dans une micro-pompe osmotique (ALZET 1003D) reliée par un cathéter à une canule qui sera implantée dans le ventricule latéral. L'ensemble de la micro-pompe est plongé dans du NaCl 0,9% à 37°C pendant 4 heures afin d'en amorcer le débit.

Les pompes sont placées dans une poche sous-cutanée au niveau de la région scapulaire de l'animal, et la canule implantée dans le ventricule latéral du cerveau selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes : latéral 0,8 mm, antéro-postérieur 0mm, dorso-ventral 2mm par rapport au Bregma du crâne pris comme origine des coordonnées.

L'infusion est effectuée durant trois jours à un débit de 1 μ l/heure. Les animaux infusés sont ensuite euthanasiés par anesthésie suivie d'une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde 4% en PBS ; les cerveaux sont prélevés et post-fixés la nuit à 4°C dans ce fixateur. Le lendemain, ils sont découpés au vibratome en coupes frontales de 50 μ m d'épaisseur.

Les coupes sont soit observées immédiatement après montage dans du milieu de montage (DAKO+DAPI) dans le cas d'une fluorescence directe (GFP ou CY3), soit utilisées pour l'immunodétection de la protéine hétérologue exprimée par le phage (dans le cas du phage exprimant la GFP ou En2). La pénétratine est détectée par une streptavidine couplée au fluorochrome Cy3 (IMMUNOTECH)

Pour l'immunodétection, et/ou la détection de la pénétratine, les coupes sont préincubées environ une heure

dans du tampon PBS 5% SVF 0,25% Triton X-100 (PBST) à température ambiante. Les anticorps sont dilués dans le même tampon, au 1/5000 pour l'anticorps polyclonal anti-En2, et au 1/500 pour l'anticorps polyclonal l'anti-GFP (SANTA-CRUZ), et

5 incubés avec les coupes la nuit à 4°C. Les coupes sont ensuite rincées 3x15min dans du tampon PBS ; un anticorps secondaire fluorescent anti-immunoglobulines de lapin couplé au FITC (JACKSON) est ensuite ajouté après dilution au 1/500ème en PBST.

10 Pour la détection de la pénétratine, la streptavidine fluorescente est diluée au 1/500ème dans le PBST.

Après incubation d'une heure à température ambiante, et trois rinçages de 15 min dans du PBS, les coupes

15 sont montées en milieu DAKO+DAPI, et observées en microscopie confocale à épifluorescence.

Les résultats sont illustrés par les Figures 2 et 3 :

Les figures 2 A et 2 B représentent des marquages

20 sur des coupes frontales de 50µm d'épaisseur.

Figure 2 A : Détection de phage cy3 dans le parenchyme cérébral d'une souris adulte après infusion du mélange pénétratine/phage dans le ventricule latéral.

Figure 2 B : détection d'une fluorescence GFP

25 dans le parenchyme cérébral d'une souris adulte après infusion du mélange pénétratine/phage GFP dans le ventricule latéral

Figure 3 : Colocalisation de la protéine engrailed 2 et de la pénétratine dans le parenchyme cérébral d'une souris adulte après infusion du mélange pénétratine/phage codant pour En 2.

30

Figure 3 A : immunodétection de la protéine Engrailed 2 codée par le phage

Figure 3 B : détection sur la même coupe de la pénétratine à l'aide de streptavidine fluorescente

35

Les figures 3 D et 3 E sont respectivement des agrandissements des figures 3 A et 3 B

REVENDICATIONS

1) Procédé pour préparer une composition permettant d'introduire dans une cellule vivante, un cargo constitué par une macromolécule ou un assemblage moléculaire de taille inférieure ou égale à environ 1 μ m dans sa plus grande dimension et présentant à sa surface un ou plusieurs domaines hydrophobes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend l'adsorption sur le ou lesdits domaines hydrophobes, d'au moins un peptide transducteur, à l'exception des peptides transducteurs de 16 à 30 acides aminés comprenant un domaine hydrophobe contenant 3 à 5 résidus tryptophane dont au moins une paire Trp-Trp, alternant avec des résidus acide glutamique et thréonine, et un domaine hydrophile contenant 4 ou 5 résidus basiques consécutifs.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le cargo est une protéine ou une particule possédant une surface de nature protéique.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le cargo est une particule virale ou pseudovirale.

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le cargo est un bactériophage.

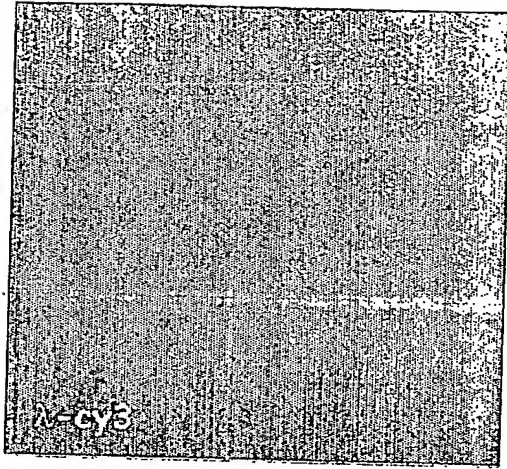
5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le peptide transducteur est un peptide de la famille des pénétratines.

6) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'adsorption du peptide transducteur est effectuée par incubation pendant au moins 15 minutes dudit peptide transducteur avec le cargo.

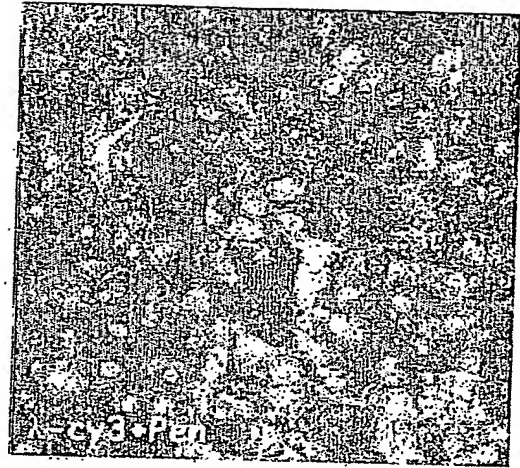
7) Composition comprenant un cargo à la surface duquel est adsorbé un peptide transducteur, susceptible d'être obtenue par un procédé selon une quelconque des revendications 1 à 6.

8) Utilisation d'une composition selon la revendication 7 pour introduire ledit cargo dans une cellule vivante en culture.

9) Utilisation d'une composition selon la
revendication 7 pour l'obtention d'un médicament.



A



B

Fig. 1

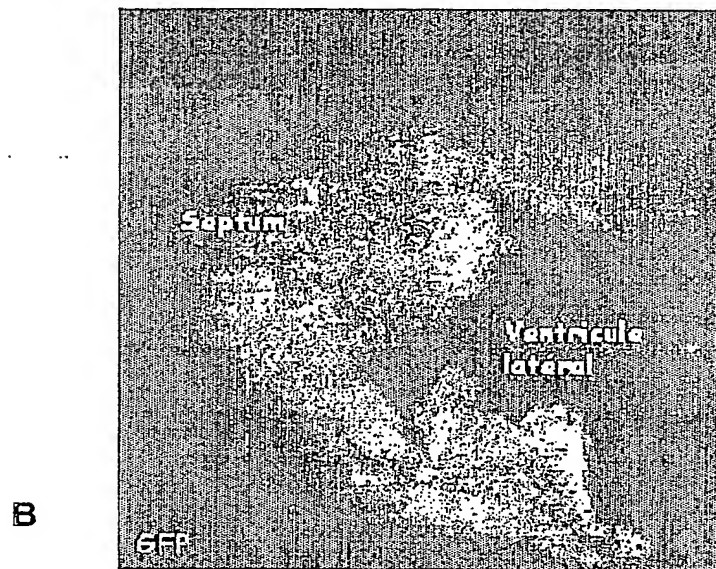
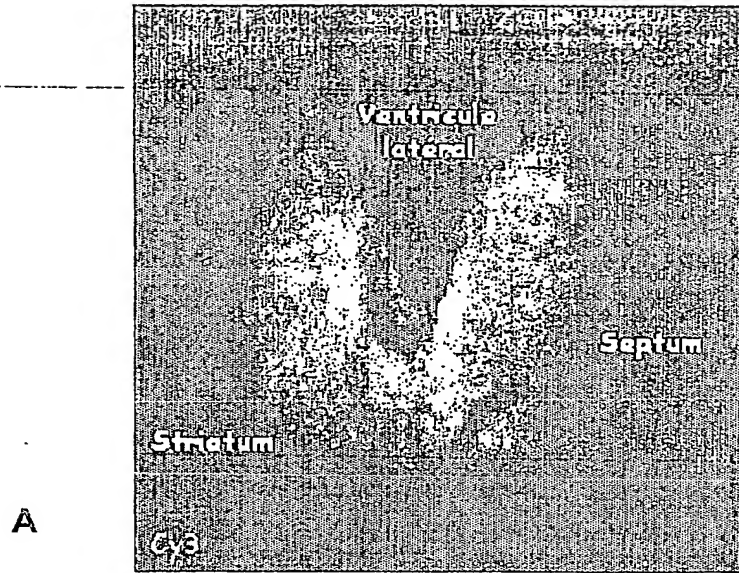
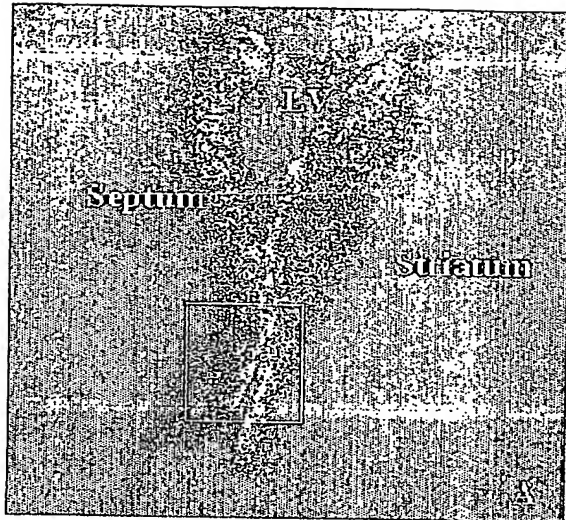


Fig. 2

Engrailed 2



Pénétratine

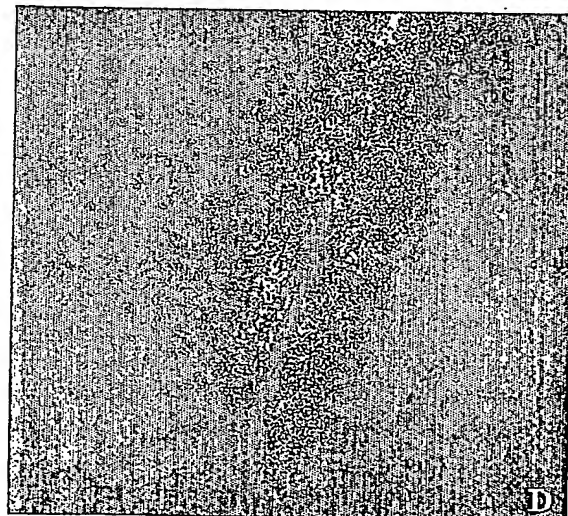
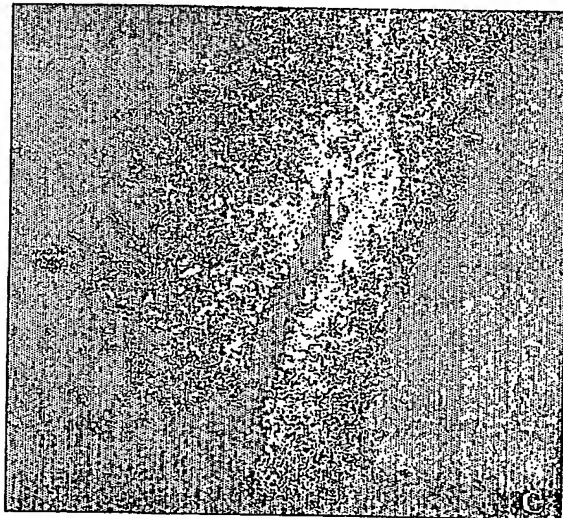
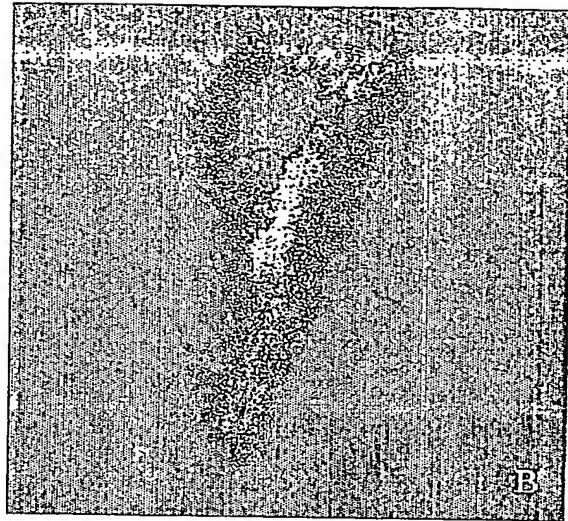


Fig. 3

DÉPARTEMENT DES BREVETS

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../2..



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 6 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv644/91
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0308093
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
COMPOSITION POUR LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE DE MACROMOLECULES OU PARTICULES BIOLOGIQUES.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) 3, rue Michel-Ange FR - 75016 PARIS		
ECOLE NORMALE SUPERIEURE 45, rue d'Ulm FR 75230 PARIS Cedex 05		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom	PROCHIA NTZ	
Prénoms	Alain Louis	
Adresse	Rue	8, rue Marie Pape-Carpantier
	Code postal et ville	75006 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom	DUPONT	
Prénoms	Edmond	
Adresse	Rue	46, rue du Fer à Moulin
	Code postal et ville	75015 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom	JOLIOT	
Prénoms	Alain	
Adresse	Rue	34, rue de Citeaux
	Code postal et ville	75012 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 7 janvier 2003 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		

Marie José Vialle-Presles

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

09 113 0 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv644/91
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0300093
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
COMPOSITION POUR LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE DE MACROMOLECULES OU PARTICULES BIOLOGIQUES.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) 3, rue Michel-Ange FR - 75016 PARIS		
ECOLE NORMALE SUPERIEURE 45, rue d'Ulm FR 75230 PARIS Cedex 05		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	TREMBLEAU
	Prénoms	Alain
	Adresse	Rue
		43, rue de la Sablière
		Code postal et ville
		9151310 YERRES
	Société d'appartenance (facultatif)	
2	Nom	VOLOVITCH
	Prénoms	Michel
	Adresse	Rue
		107, rue Monge
		Code postal et ville
		7510115 PARIS
	Société d'appartenance (facultatif)	
3	Nom	
	Prénoms	
	Adresse	Rue
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 7 janvier 2003 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		

PCT/FR2003/003951



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.